

**COLLOIDAL SUSPENSION OF NANOPARTICLES BASED ON AN AMPHIPHILIC COPOLYMER****Publication number:** FR2822834**Publication date:** 2002-10-04**Inventor:** SOULA GERARD; BRYSON NATHAN**Applicant:** FLAMEL TECH SA (FR)**Classification:**

**- international:** *A61K9/107; A61K8/06; A61K8/64; A61K8/86; A61K8/90; A61K9/51; A61K31/7088; A61K31/715; A61K38/00; A61K38/28; A61K39/00; A61P3/10; A61P5/50; A61K9/107; A61K8/04; A61K8/30; A61K8/72; A61K9/51; A61K31/7088; A61K31/715; A61K38/00; A61K38/28; A61K39/00; A61P3/00; A61P5/00; (IPC1-7): C08G69/40; A61K9/16; A61K9/51; A61K47/48; B01J13/00; C08G81/00; C08J3/05*

**- European:** A61K9/51

**Application number:** FR20010004512 20010402**Priority number(s):** FR20010004512 20010402**Also published as:**

WO02078677 (A1)  
EP1372618 (A1)  
US2004138095 (A1)  
MXPA03009007 (A)  
EP1372618 (A0)

[more >>](#)[Report a data error here](#)**Abstract of FR2822834**

The invention concerns an aqueous suspension, stable in physiological medium, of nanoparticles for delivering active principles for example insulin. Said delivering particles are based on a three-block copolymer: *<i>polyethylene glycol/hydrophilic polyaminoacid/hydrophobic polyaminoacid</i>*. Said three-block copolymer particles can be associated with an active principle without denaturing it, and perform a controlled and long-term release of said active principle in vivo, thereby providing the active principle with very prolonged release. The invention also concerns the powder-form solid from which are derived the delivering particles and the preparation of said powder-form solid and said suspension of delivering particles based on three-block copolymer. The invention further concerns pharmaceutical specialities obtainable from said delivering particles filled with active principle.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : **2 822 834**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **01 04512**

⑤1 Int Cl<sup>7</sup> : C 08 G 69/40, C 08 G 81/00, C 08 J 3/05, A 61 K 47/  
48, 9/16, 9/51, B 01 J 13/00

①2 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②2 Date de dépôt : 02.04.01.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 04.10.02 Bulletin 02/40.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *FLAMEL TECHNOLOGIES Société  
anonyme — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : SOULA GERARD et BRYSON  
NATHAN.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET PLASSERAUD.

⑤4 **SUSPENSION COLLOIDALE DE NANOPARTICULES A BASE DE COPOLYMERES AMPHIPHILE POUR LA  
VECTORISATION DE PRINCIPES ACTIFS ET LEUR MODE DE PREPARATION.**

⑤7 L'invention concerne une suspension aqueuse, stable  
en milieu physiologique, de nanoparticules de vectorisation  
PV de principes actifs PA (par ex. insuline). Ces PV sont à  
base d'un copolymère tribloc: PolyEthylène-Glycol/ poly-  
aminoacide hydrophile/ polyaminoacide hydrophobe. Ces  
particules de copolymère tribloc peuvent s'associer à un PA  
sans le dénaturer, puis relarguer ce PA in vivo de façon con-  
trôlée et pendant une très longue durée. Cela assure donc  
au PA une durée d'action très prolongée.

L'invention vise, également, le solide pulvérulent à partir  
duquel sont issues les PV ainsi que la préparation de ce so-  
lide pulvérulent et de cette suspension de PV à base de co-  
polymère tribloc.

L'invention concerne les spécialités pharmaceutiques  
susceptibles d'être obtenues à partir de ces particules de  
vectorisation chargées en principe actif.

FR 2 822 834 - A1



Le domaine de la présente invention est celui des  
5 Nanoparticules de Vectorisation (PV), utiles pour  
l'administration de principes actifs (PA). Ces derniers sont,  
de préférence, des médicaments ou des nutriments pour  
l'administration à un organisme animal ou humain par voie orale  
ou nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse,  
10 intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale,  
intracérébrale, etc. En termes de nature chimique, les PA plus  
particulièrement concernés par l'invention sont hydrophiles,  
par exemple, des protéines, des glycoprotéines, des peptides,  
des polysaccharides, des lipopolysaccharides, ou des  
15 polynucléotides.

La présente invention concerne, plus précisément, des  
suspensions colloïdales de Nanoparticules de Vectorisation  
(PV), à base de blocs de polyaminoacides et polymères  
hydrophiles du type PolyAlkylène-Glycol (PAG), de préférence  
20 PolyEthylène-Glycol (PEG).

La présente invention vise aussi bien des PV en tant que  
telles, que des systèmes vecteurs de PA, constitués par des PV  
chargées en PA.

La présente invention a également trait à des solides  
25 pulvérulents comprenant ces PV.

L'invention concerne, également, des procédés de  
préparation desdites suspensions colloïdales de particules,  
chargées en PA.

L'association de PA avec des PV a notamment, pour but de  
30 modifier leur durée d'action et/ou de les acheminer au lieu du  
traitement et/ou augmenter la biodisponibilité desdits PA. De  
nombreuses techniques d'association ont déjà été proposées. De  
telles techniques visent, d'une part, à permettre le transport  
du PA jusqu'à son site d'action thérapeutique, tout en le  
35 protégeant contre les agressions de l'organisme (hydrolyse,

digestion enzymatique, etc.) et, d'autre part, à contrôler la libération du PA sur son site d'action, afin de maintenir la quantité disponible pour l'organisme au niveau désiré. Les PA concernés par ces avatars de transport et de séjour dans l'organisme sont, par exemple, des protéines mais peuvent être, également, des produits tout autre, des molécules organiques d'origine synthétique ou naturelle. La revue de M.J. HUMPHREY (Delivery system for peptide Drugs, éditée par S. DAVIS et L. ILLUM, Plenum Press, N.Y. 1986), fait état de la problématique concernant l'amélioration de la biodisponibilité des PA et l'intérêt des systèmes de vectorisation et de libération contrôlée.

En fait, on distingue deux types principaux de systèmes de vectorisation et de libération contrôlée de PA, qui sont caractérisés par le mode d'association du PA avec les PV, à savoir :

- l'association par adsorption, illustrée par la figure 1 annexée,
- et l'association par encapsulation (ou par enrobage), illustrée par la figure 2 annexée,

L'association du PA aux PV par adsorption spontanée, est celle qui est concernée par la présente invention. Généralement, les techniques d'adsorption spontanée sont moins agressives vis à vis des PA que les techniques d'association par encapsulation, dans lesquelles on a souvent recours à des solvants et/ou des tensioactifs, ainsi que des étapes de procédé (émulsification, évaporation, distillation), propres à dénaturer les PA, et en particulier les PA de nature protéique (préservation de la structure secondaire native), qui constituent la majorité des PA usuels visés. Dans le cas d'une association par adsorption, la libération s'opère par désorption.

Au delà des modes d'association/relargage du PA vis à vis des PV, les matériaux constitutifs des PV doivent présenter des

propriétés d'usage particulières. Finalement, le cahier des charges que l'on souhaite obtenir pour les PV est particulièrement exigeant et comprend, notamment, les spécifications suivantes.

- 5           1    La première spécification recherchée pour les PV est :
  - o d'une part, que les PV s'associent aisément avec les PA pour former des systèmes PV-PA qui permettent une libération et une action prolongées du PA in vivo (par exemple, une  
10               durée d'action d'au moins 24 heures pour un PA = insuline),
  - o et d'autre part, que ces PV (chargées ou non en PA) forment des suspensions aqueuses stables (par exemple au moins pendant plusieurs mois),  
15               sans l'aide de solvant organique et/ou de tensioactif; c'est-à-dire les PV se maintiennent en suspension et ne flocculent pas.
- 2    Les PV doivent être constituées d'un (co)polymère biocompatible, éliminable (par excrétion) et/ou  
20               biodégradable rapidement en produits non toxiques pour l'organisme.
- 3    Il est également recherché que les PV aient une taille suffisamment faible pour pouvoir subir, en suspension dans un liquide, une filtration stérilisante par un  
25               filtre dont le diamètre des pores est inférieur ou égal à 0,2  $\mu\text{m}$ .
- 4    Il est souhaitable que les PV et les systèmes PV-PA puissent être obtenus par un procédé non dénaturant pour le PA.
- 30           5    Les PV doivent, avantageusement, permettre de contrôler la vitesse de libération du PA.
- 6    Une autre spécification importante est que les systèmes PV-PA puissent constituer d'excellents médicaments injectables. Cette aptitude améliorée de  
35               l'administration par injection -e.g. intraveineuse ou

intramusculaire- « injectabilité » se caractérise par :

(i) un volume injecté réduit (pour une dose thérapeutique donnée),

5 (ii) une viscosité faible.

Ces deux propriétés sont satisfaites lorsque la dose thérapeutique de **PA** est associée à une quantité minimale de **PV**. En d'autres termes, les **PV** doivent avoir un fort taux de chargement en **PA**.

10 7 Le coût propre aux **PV** dans une préparation injectable doit être réduit et là encore il convient que les **PV** aient un fort taux de chargement en **PA**. En définitive, la faible taille et un fort taux de chargement sont des spécifications majeures recherchées pour les **PV**.

15 8 Il est également avantageux que le polymère, constitutif des **PV**, n'induisse pas de réponse immunitaire.

9 Enfin, il est avantageux que les **PV** aient une durée de vie dans l'organisme au moins égale au temps de libération recherchée pour le **PA**.  
20

Les propositions techniques antérieures (a) à (g), décrites infra, ont tenté de satisfaire, en vain, à l'ensemble de ces spécifications.

25 (a) Le brevet US-A-5 286 495 concerne un procédé d'encapsulation par vaporisation de protéines en phase aqueuse, à l'aide de matériaux ayant des charges opposées, à savoir : l'alginate (chargé négativement) et la polylysine (chargée positivement). Ce procédé de  
30 fabrication permet de produire des particules de taille supérieure à 35  $\mu\text{m}$ .

(b) Par ailleurs, les techniques d'émulsion sont couramment utilisées pour préparer des microparticules chargées de **PA**. Par exemple, les demandes de brevets WO 91/06286, WO  
35 91/06287 et WO 89/08449 divulguent de telles techniques

d'émulsion dans lesquelles on a recours à des solvants organiques pour solubiliser des polymères, par exemple de type polylactique. Mais il s'est avéré que les solvants peuvent être dénaturants, notamment pour les PA peptidiques ou polypeptidiques.

- 5 (c) On connaît, également, des PV biocompatibles appelées protéinoïdes, décrites dès 1970 par X. FOX et K. DOSE dans « Molecular Evolution and the origin of Life », Ed. Marcel DEKKER Inc (1977). Ainsi, la demande de brevet WO 88/01213 propose un système à base d'un mélange de polypeptides synthétiques, dont la solubilité dépend du pH. Pour obtenir 10 les microparticules matricielles selon cette invention, ils solubilisent le mélange de polypeptides, puis avec un changement de pH, ils provoquent la précipitation de particules protéinoïdes. Lorsque la précipitation 15 s'effectue en présence d'un PA, celui-ci est encapsulé dans la particule.
- (d) On mentionnera également, pour mémoire, le brevet US 4 351 337 qui relève d'un domaine différent de celui de la 20 vectorisation de PA propre à l'invention. Ce brevet divulgue des implants massiques fixés et localisés à des endroits bien précis de l'organisme. Ces implants sont des tubes ou des capsules creuses de taille microscopiques (160  $\mu\text{m}$  et de longueur égale à 2 000  $\mu\text{m}$ ), constitués de 25 copolymères de copoly(aminoacides) -e.g. poly(acide glutamique-leucine) ou poly(benzylglutamate-leucine)- obtenus par copolymérisation de monomères de N-carboxyanhydrides d'aminoacides (NCA). L'inclusion d'un PA s'opère par une technique d'évaporation de solvant d'un 30 mélange de polymère et de PA. Le brevet US 4 450 150 appartient à la même famille que le brevet US 4 351 337 étudié ci-dessus et a essentiellement le même objet. Les PAA constitutifs sont des poly(acide glutamique-éthylglutamate).

- (e) La demande de brevet PCT/FR WO 97/02810 divulgue une composition pour la libération contrôlée de principes actifs, comprenant une pluralité de particules lamellaires d'un polymère biodégradable, au moins en partie cristallin (polymère d'acide lactique) et d'un PA adsorbé sur lesdites particules. Dans ce cas, la libération du principe actif s'opère par désorption.
- (f) La demande PCT WO 96/29991 a pour objet des particules de polyaminoacides utiles pour la vectorisation de PA tels que l'insuline. Ces particules ont une taille comprise entre 10 et 500 nm.
- Les particules selon le WO 96/29991 se forment spontanément par mise en contact de PAA avec une solution aqueuse. Les PAA comprennent un bloc hydrophobe formé par des monomères aminoacides neutres et hydrophobes AAO (polyLeu) et un bloc hydrophile formé par des monomères ionisables et hydrophiles AAI (polyGlu).
- (g) L'EP 0 583 955 divulgue des micelles polymère capables de piéger physiquement des PA hydrophobes. Ces micelles sont constitués par des copolymères bloc comportant un bloc hydrophile constitué par du PolyEthylèneGlycol (PEG) et un bloc hydrophobe constitué par un PolyAminoAcide, par exemple : PEG/polyAANO (AANO = Amino-Acide Neutre hydrophObe).
- L'AANO peut être : Leu, Val, Phe, Bz-O-Glu, Bz-O-Asp, ce dernier étant préféré. Les principes actifs PA hydrophobes piégés dans ces micelles PEG/polyAANO sont e.g.: adriamycine, indométhacine, daunomycine, methotrexate, mitomycine.
- Dans cette demande de brevet, seuls sont exemplifiés les micelles à base de PEG/polyGlu-O-Bz. Or, il est à noter que ces esters Glu-O-Bz ne sont pas stables à l'hydrolyse en milieu aqueux. En outre, l'hydrolyse enzymatique de ces produits forme des dérivés non naturels du benzène potentiellement toxique. Par ailleurs, il n'est nullement



question dans ce document de particules constituées par un copolymère bloc PEG/polyAANO, dont le coeur est formé par le polyamino acide neutre hydrophobe et comprenant une chevelure externe hydrophile à base de PEG, ces particules  
5 étant aptes à s'associer avec des PA hydrophiles et à les libérer in vivo.

On sait par ailleurs que les PEG ne sont pas biodégradables et sont même susceptibles de protéger des PV  
10 d'une dégradation enzymatique, nuisant ainsi à la biodégradabilité in vivo des PV, l'une des caractéristiques essentielles recherchées dans le cadre de la présente invention.

15 Il ressort donc de ce qui précède que les propositions techniques antérieures susdécrites satisfont incomplètement aux spécifications du cahier des charges indiqué supra, et, en particulier les spécifications 1 (durée de libération et d'action in vivo prolongée et stabilité en suspension aqueuse  
20 des PV), 2 (biodégradabilité), 4 (obtention non dénaturante), 5 (contrôle vitesse libération), 8 (absence de réponse immunitaire).

Dans cet état de fait, l'un des objectifs essentiels est  
25 de pouvoir fournir de nouvelles PV (du type adsorption/désorption) qui forment spontanément, et sans l'aide de tensioactifs ni de solvants organiques, des suspensions aqueuses stables de PV et adaptées à la vectorisation de PA (notamment des protéines telles que l'insuline), et surtout qui  
30 permettent d'augmenter significativement la durée de libération et d'action in vivo du PA, par rapport aux systèmes de vectorisation connus dans l'art antérieur et présentés ci-dessus (a-g, vide supra).

Un autre objectif essentiel de la présente invention est  
35 de fournir de nouvelles PV en suspension aqueuse colloïdale

stable (notamment à l'hydrolyse) ou sous forme pulvérulente et à base de copolymères bloc PolyAlkylèneGlycol (PAG)/poly(aminoacides) (PAA), ces nouvelles **PV** se devant de satisfaire au mieux aux spécifications 1 à 9 du cahier des charges susvisé.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de perfectionner les particules divulguées dans la demande EP 0 583 955.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension de **PV**, qui, bien que possédant une couronne extérieure de PEG, soit cependant facilement biodégradable.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension nouvelle de **PV** dont on maîtrise parfaitement les caractéristiques, notamment en termes du taux de chargement en **PA** et en termes de contrôle de cinétique de libération du **PA**.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des suspensions de **PV** médicamenteuses stables et administrables à l'homme ou l'animal, par voie orale ou parentérale, par exemple.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension colloïdale aqueuse ou un solide pulvérulent comprenant des particules de vectorisation de principes actifs satisfaisant aux spécifications visées ci-dessus et qui constitue une forme galénique appropriée et convenable pour une administration, par exemple orale, à l'homme ou l'animal.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer un procédé de préparation de particules (sèches ou en suspension dans un liquide) de PAA utiles, notamment, comme vecteurs de principes actifs (notamment protéines telles que l'insuline), ledit procédé se devant d'être, plus simple à mettre en œuvre, non dénaturant pour les principes actifs et devant en outre toujours permettre une maîtrise fine de la granulométrie moyenne des particules obtenues.

Un autre objectif essentiel de l'invention est l'utilisation des susdites particules en suspension aqueuse ou

sous forme solide pour la préparation de médicaments (e.g. vaccins), en particulier pour administration notamment orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intra-péritonéale, ou intracérébrale, les principes actifs hydrophiles de ces médicaments  
5 pouvant être, notamment, des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligonucléotides et des polynucléotides.

Un autre objectif de la présente invention est de fournir  
10 un médicament, du type système à libération prolongée de principes actifs, qui soit aisé et économique à produire et qui soit, en outre, biocompatible et apte à assurer un très haut niveau de biodisponibilité du PA.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir  
15 un système de vectorisation de vaccin, qui soit non immunogène intrinsèquement et en combinaison avec un ou plusieurs antigènes.

Ces objectifs (parmi d'autres) sont atteints par la  
20 présente invention qui concerne, tout d'abord, une suspension colloïdale de nanoparticules susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s) (PA), ces particules étant des arrangements supramoléculaires individualisés. Cette suspension a ceci de particulier, que  
25 lesdites particules :

- sont à base d'au moins un copolymère amphiphile comprenant :
  - ✓ au moins un bloc de polymère(s) hydrophile(s) du type polyalkylèneglycol (PAG), de préférence polyéthylène-glycol (PEG) ;
  - ✓ et au moins un copolyaminoacide(s) (PAA) amphiphile linéaire(s), à enchaînements  $\alpha$ -peptidiques;
- et sont aptes à s'associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, avec au moins un PA et à libérer

celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée .

L'un des fondements inventifs de ces nouvelles particules de vectorisation PV, en suspension aqueuse colloïdale stable ou à l'état de solide pulvérulent, tient à la sélection originale d'un copolymère PAG/PAA amphiphile, par exemple un terpolymère bloc [polymère hydrophile/ polyaminoacide hydrophile /polyaminoacide hydrophobe],  
10 permettant d'obtenir des particules de taille nanométrique (10-500nm), qui forment une suspension colloïdale aqueuse stable, tant vis à vis de l'hydrolyse que de la floculation, en l'absence de tensioactifs et/ou de solvants et qui puissent se  
15 lier à des PA par adsorption et libérer ces PA par désorption. Dans le cas de la présente invention, l'adsorption se fait naturellement et spontanément lorsque les particules colloïdales et le PA sont mis en contact dans un milieu aqueux. L'adsorption dépend de la nature du support (PV) et la quantité  
20 de support accessible au PA.

L'un des intérêts majeurs de la présente invention est qu'elle conduit à un système PV-PA ayant une durée d'action in vivo augmentée de manière significative (par exemple de 10h lorsque PA = insuline), par rapport aux systèmes connus, et  
25 notamment par rapport au système décrit dans la demande de brevet WO 96/29991 et comprenant des PV poly(Glu)/polyLeu.

Par ailleurs, le fait que les PV soient en partie constituées d'un polyaminoacide hydrophile offre l'avantage d'une possibilité aisée de dégradation des PV par hydrolyse  
30 enzymatique, ce qui facilite leur élimination de l'organisme.

De préférence, les AminoAcides du (ou des) copolyaminoacide(s) (PAA) amphiphile (s) composant les particules sont d'au moins deux types :

➤ un premier type comprenant au moins un AminoAcide  
35 hydrophile(AAI)

- un deuxième type comprenant au moins un AminoAcide hydrophobe (AAO)

En pratique, le copolyaminoacide(s) (PAA) amphiphile (s) composant les particules comporte avantageusement au moins une séquence globalement hydrophile et au moins une séquence globalement hydrophobe.

Conformément à l'invention, la structure des copolymères amphiphiles et la nature des acides aminés AAI et AAO, sont choisies de telle façon que :

- les chaînes de polymères se structurent spontanément sous forme de particules (PV) de petite taille,
- les particules forment une suspension colloïdale stable dans l'eau et en milieu physiologique,
- les PV s'associent avec des protéines ou autres PA en milieu aqueux (en l'absence de solvant organique et/ou de tensioactif), par un mécanisme spontané et non dénaturant pour le PA,
- les PV libèrent les PA du complexe d'association PA-PV dans les conditions physiologiques, et plus précisément in vivo, avec des profils pharmacocinétique et pharmacodynamique idoines pour des utilisations à titre de médicaments; la cinétique de libération est fonction de la nature du copolymère PAG/PAA (=PolyAAI/PolyAAO )précurseur des PV.

Ainsi, en jouant sur la structure bloc particulière du copolymère, on peut contrôler les phénomènes d'association et de libération du PA sur le plan cinétique et quantitatif.

La fraction hydrophobe polyAAO participe à l'agrégation des chaînes polymères, ce qui est au cœur de la formation des PV.

Suivant une modalité remarquable de l'invention:

- l'(ou les)aminoacide(s) hydrophIle(s) (AAI), sont sélectionné(s) dans le groupe comprenant :
  - les AminoAcides à chaîne(s) ionisable(s), au moins partiellement ionisés, de préférence Glu et/ou Asp et leurs sels et/ou Lys; naturels et non-naturels
  - et leurs mélanges;
- et l'(ou les) AminoAcide(s) hydrophObe(s) (AAO), sont sélectionné(s) dans le groupe comprenant :
  - les acides aminés neutres naturels, avantageusement ceux du sous-groupe : Leu, Ile, Val, Ala, Pro, Phe, et leurs mélanges ;
  - des acides aminés neutres, rares ou synthétiques , avantageusement ceux du sous-groupe : norleucine, norvaline et leurs mélanges;
  - des dérivés des acides aminés polaires avantageusement ceux du sous-groupe : glutamate de méthyle, glutamate d'éthyle, aspartate de benzyle, N-acétyllysine et leurs mélanges;
  - et leurs mélanges.

20

Selon un préféré de réalisation de l'invention, le copolyaminoacide(s) (PAA) amphiphile (s) composant le copolymère amphiphile constitutif des particules, présente une structure "bloc".

25

Selon une variante, ce copolyaminoacide(s) (PAA) amphiphile (s) peut avoir une structure "statistique" (ou "aléatoire" ou "randomisée"), pour autant qu'il comporte toujours au moins une séquence globalement hydrophile et au moins un séquence globalement hydrophobe, qui lui confère son

30

amphiphilie.

Le PAA amphiphile "bloc" préféré comporte avantageusement:

- o au moins une séquence globalement hydrophile essentiellement constituée d'aminoacides AAI, et ayant une longueur absolue supérieure ou égale à 5 monomères AAI, de préférence

35

supérieure ou égale à 200 monomères AAI, et plus préférentiellement encore comprise entre 10 et 50 monomères AAI

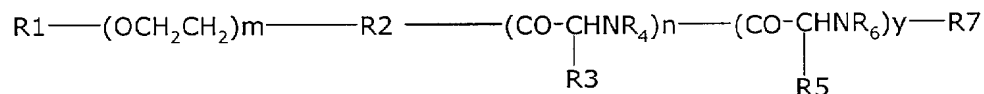
o et au moins une séquence globalement hydrophobe essentiellement constituée d'acides aminés AAO, ayant une longueur absolue supérieure ou égale à 5 monomères AAO, de préférence supérieure ou égale à 10 monomères AAO, et plus préférentiellement comprise entre 10 et 50 monomères AAO.

S'agissant du PAG hydrophile - de préférence le PEG -, il se présente avantageusement sous la forme d'un bloc dont la longueur absolue est supérieure ou égale à 5 monomères, de préférence comprise entre 5 et 120 monomères, et plus préférentiellement encore comprise entre 5 et 50 monomères. Il est à noter que les blocs de PAG (e.g. PEG) peuvent être des homopolymères ou des copolymères, les homopolymères étant plus particulièrement appréciés.

De manière plus préférée encore, il est du mérite de la demanderesse d'avoir choisi, à titre de matériau constitutif des **PV**, une classe particulière de terpolymères bloc : *polymère hydrophile/polyaminoacide hydrophile/polyaminoacide hydrophobe*, qui sont amphiphiles et chargés. Cette amphiphilie permet d'obtenir des propriétés nouvelles et surprenantes et notamment celles évoquées ci-dessus. Ainsi, les **PV** selon l'invention forment des suspensions aqueuses stables, en l'absence de tout tensioactif et de tout solvant organique et à des pH physiologiques. De plus, grâce au choix de la structure en tribloc, incorporant une séquence hydrophile à base d'acides aminés entre la partie PAG et la partie hydrophobe, les **PV** sont facilement dégradables in vivo par une réaction d'hydrolyse enzymatique. C'est l'un des points clés du système terpolymère selon le mode préféré de réalisation de l'invention.

En outre, les associations **PV-PA** se font spontanément et surtout permettent une libération et donc une action in vivo pendant de très longues durées (par exemple, 30 heures et plus avec une protéine telle que l'insuline). Ainsi, le temps  
 5 d'action du **PA** in vivo est suffisamment long pour augmenter significativement la couverture thérapeutique et par suite améliorer le confort du patient.

Suivant un exemple de réalisation concret de l'invention,  
 10 les particules sont constituées de chaînes de copolymères amphiphiles "triblocs linéaires" PEG/AAI/AAO, correspondant de préférence à la formule suivante :



15 dans laquelle :

- ➡ R1 = H, alkyle linéaire ou branché en C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (substitué ou non), aryle de préférence benzyle (substitué ou non);
- ➡ R2 = NH, CO-NH, CS-NH, R8-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-R9 avec R8, R9  
 20 choisi indépendamment parmi = OCO, OCONH, NHCO, NHCONH, CONH, COO, NH, CO; t = 1-6, [NHCH(R1)CO-]<sub>x</sub>;
- ➡ R3 = radicaux identiques ou différents le long de la chaîne et choisis parmi les groupements définissant des aminoacides hydrophiles, ionisables  
 25 (naturels ou dérivés synthétiques) à savoir de préférence les groupements (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OM, (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>CO<sub>2</sub>M, (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>N(H<sub>c</sub>R1<sub>d</sub>)<sub>3</sub>X avec p ≥ 1, de préférence = 1 ou 2; a et b sont des valeurs comprise entre 0 et 3 et a+b = 3 ; X étant de préférence un anion chlorure,  
 30 bromure, sulfate, nitrate, hydrogeno-phosphate, acétate, lactate ;
- ➡ R4 = radicaux identiques ou différents le long de la chaîne et choisis parmi les groupements H, Me;



- ➔ R5 = radicaux identiques ou différents le long de la chaîne et choisis parmi les groupements définissant des aminoacides hydrophobes (naturels ou dérivés synthétiques) à savoir de préférence les groupements H, R1,  $(CH_2)_q C_6H_5$ ,  $(CH_2)_q C_6H_4OR1$ ,  $(CH_2)_q OR1$ ,  $(CH_2)_q CO_2R1$ ,  $(CH_2)_q CON(R1)_2$ , avec  $q \geq 1$ , de préférence = 1 ou 2;
- ➔ R6 = R4 ;
- ➔ R7 = H, R1CO avec R1 tel que défini supra, alkyle linéaire ou branché en  $C_1-C_{20}$  (substitué ou non), aryle de préférence benzyle (substitué ou non), hydroxyalkyle en  $C_1-C_6$ , H,  $-(CH_2)_w OH$ ,  $-(CH_2)_w CO_2M$ ,  $-(CH_2)_w (CHR1)_z OH$ ,  $-(CH_2)_w NH_2$ ,  $-(CH_2)_y C_6H_4 OH$ ,  $(CH_2)_y CO-N(R1)_2$ ; R10 = H, Me,  $(CH_2)_v OH$ , avec w, z et v  $\geq 1$  et M = métal ou cation, typiquement un métal alcalin comme Na, Li, K, ou  $NH_4$ ,  $R1_a NH_b$ ;
- ➔  $m > 1$ ;  $n > 3$ ;  $y \geq 0$ ;  $a+b = 4$ .

Conformément à l'invention, le fait d'avoir une séquence hydrophile polyaminoacide (polyAAI) dans le copolymère constitutif des PV, est une disposition particulièrement avantageuse en ce que cela améliore la biodégradabilité des PV. Cette séquence PolyAAI est préférablement disposée entre un bloc polymère hydrophile et une séquence hydrophobe polyaminoacide (polyAAO).

Les particules PV selon l'invention ont une taille moyenne comprise entre 10 et 500 nm, de préférence entre 10 et 200 nm. Au sens de l'invention, on entend, par taille ou granulométrie moyenne, le diamètre hydrodynamique moyen.

L'un des atouts de l'invention est d'être parvenu à un très bon contrôle de la granulométrie moyenne des ces entités et de leur répartition granulométrique. Le contrôle de l'autoassociation des chaînes de polymère et donc, de la taille PV, s'opère par l'intermédiaire de la composition en polyaminoacides, mais aussi, pour une même composition, par le

choix d'une structure bloc et le procédé d'obtention. De cette manière, la taille des particules est extrêmement faible, de l'ordre de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres.

5           La suspension selon l'invention est aqueuse et stable.

La présente invention vise, non seulement des suspensions de particules nues, telles que définies ci-dessus, mais également des suspensions de particules comprenant au moins un principe actif **PA**.

10           Ces particules, associées ou non avec un **PA**, sont, avantageusement, sous forme dispersée dans un liquide aqueux, mais peuvent également être à l'état de solide pulvérulent, obtenu à partir de la suspension de **PV** telle que définie ci-dessus.

15           L'invention concerne, donc, outre une suspension colloïdale aqueuse de **PV**, un solide pulvérulent comprenant des **PV** et obtenu à partir de la suspension selon l'invention.

Il est à noter que la nature de la distribution des groupements hydrophobes sur les chaînes de polymères est  
20           contrôlable de par la voie de synthèse choisie. A cet égard, il existe de nombreux schémas réactionnels conduisant aux polymères sélectionnés comme matière première pour l'obtention des **PV** selon l'invention.

Conformément à l'invention, on retient un mode particulier  
25           de préparation des **PV** et de la suspension de **PV**.

Ainsi, un autre objet essentiel de l'invention se rapporte à la préparation des particules sélectionnées (telles que décrites ci-avant), aussi bien sous forme de suspension colloïdale que sous forme de solide pulvérulent. Le procédé de  
30           préparation considéré consiste, essentiellement :

\* à synthétiser des copolymères PAG/polyAAI/polyAAO précurseurs des **PV** et à les transformer en particules **PV** structurées ;

\* éventuellement à purifier les particules ainsi  
35           produites ;

\* éventuellement à isoler ces particules, de préférence par concentration, lyophilisation, filtration ou séchage.

5 Plus précisément, il s'agit, tout d'abord, d'un procédé de préparation du solide pulvérulent susvisé et formé par de particules structurées nanométriques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s), ces particules étant des arrangements  
10 supramoléculaires individualisés :

- à base d'au moins un copolymère amphiphile comprenant :
  - ✓ au moins une séquence hydrophobe de polyaminoacide(s) (PAA) linéaire(s), à enchaînements  $\alpha$ -peptidiques, les aminoacides hydrophobes AAO constitutifs de ce bloc  
15 PAA étant identiques ou différents entre eux ;
  - ✓ au moins une séquence hydrophile de polyaminoacide(s) (PAA) linéaire(s), à enchaînements  $\alpha$ -peptidiques, les aminoacides hydrophobes AAI constitutifs de ce bloc PAA étant identiques ou différents entre eux ;
  - 20 ✓ et au moins un bloc de polymère(s) hydrophile(s) du type polyalkylèneglycol (PAG), de préférence polyéthylène-glycol (PEG) ;
- aptes à s'associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment  
25 in vivo, de manière prolongée et/ou retardée .

Ce procédé est caractérisé en ce que :

- 1) on fait réagir au moins un bloc PAG comprenant au moins un monomère alkylène-glycol, avec au moins une séquence hydrophile de PAA comprenant au moins un  
30 monomère aminoacide AAI hydrophile et avec au moins une séquence hydrophobe de PAA comprenant au moins un monomère aminoacide AAO hydrophobe, ce bloc de PAG et ces séquences comprenant chacun au moins une fonction réactive de façon à obtenir un copolymère amphiphile  
35 "bloc" PAG/polyAAI/polyAAO ;

- 2) on transfère le copolymère amphiphile bloc PAG/polyAAI/polyAAO obtenu à l'étape 1, dans un milieu non-solvant de la (des) fraction(s) hydrophobe(s) du copolymère amphiphile - de préférence dans l'eau -, ce qui conduit à la formation spontanée de particules de vectorisation (PV) ;
- 3) éventuellement on dialyse le milieu réactionnel pour purifier la suspension aqueuse de particules structurées ;
- 4) éventuellement on concentre cette suspension de l'étape 3 ;
- 5) éventuellement on associe au moins un principe actif PA avec les particules de l'étape 2, 3 ou 4 ;
- 6) on élimine le milieu liquide pour recueillir le solide pulvérulent comprenant les particules chargées ou non.

Au sens de l'invention, l'expression "non-solvant" signifie que les fractions du copolymère amphiphile considéré, ont par exemple une solubilité inférieure à 1g/l, à 25°C dans le milieu non-solvant considéré.

En fin d'étape 2, le milieu liquide ne forme pas une solution homogène, mais se sépare en une phase dispersée (PV) et une phase pauvre en copolymère amphiphile "bloc".

Les fonctions réactives du (ou des) bloc(s) PAG et des séquences polyAAO et polyAAI de l'étape 1, peuvent être des fonctions amine ou acide carboxylique. On peut envisager de réaliser la polymérisation conduisant au(x) bloc(s) PAG et/ou au(x) séquence(s) hydrophile(s) PolyAAI et/ou au(x) séquence(s) hydrophobe(s) PolyAAO avant, pendant ou après la formation de la liaison PAG-PolyAAI et/ou PAG-PolyAAO et/ou PolyAAI-PolyAAO.

Toutes ces variantes sont à la portée de l'homme de l'art.

De préférence, dans l'étape 1 :

- 1.1) on réalise une copolymérisation de monomères formés par des anhydrides de N-CarboxyAminoacides (NCA) d'au

moins deux types différents, d'une part, des NCA-pAAI («pAAI » désignant un précurseur d'AAI) et, d'autre part, des NCA-AAO en présence :

- 5                   - d'au moins un solvant polaire, de préférence choisi dans le groupe comprenant : la N-MéthylPyrrolidone (NMP), le DiMéthylFormamide (DMF), le DiMéthylsulfoxyde (DMSO), le DiMéthylAcétamide (DMAc), la pyrrolidone ; la NMP étant plus particulièrement préférée ;
- 10                  - et éventuellement d'au moins un co-solvant sélectionné parmi les solvants aprotiques (de préférence le dioxanne-1,4) et/ou les solvants protiques (de préférence la pyrrolidone) et/ou l'eau et/ou les alcools, le méthanol étant
- 15                   particulièrement préféré ;
- on transforme les motifs récurrents pAAI du copolymère précurseur PAA des particules, en motifs récurrents AAI, en mettant en œuvre une hydrolyse, de préférence acide, pour laquelle on ajoute au
- 20                   milieu organique susdécrit une phase aqueuse acide ;
- 1.2) on met en œuvre ou on prépare par polymérisation de monomères alkylène-glycol (de préférence éthylène ou propylène-glycol) au moins un bloc polymère PAG de
- 25                   poly-alkylène-glycol (de préférence de PEG ou PPG) ; ce bloc PAG étant fonctionnalisé (avantageusement seulement à l'une de ses extrémités) par un groupement réactif, de préférence choisi dans le
- groupe comprenant les amines (en particulier les amines primaires ou secondaires), les alcools ou les
- 30                   thiols, les acides carboxyliques activées (par réaction préalable avec du dicyclohexylcarbodiimide, carbonyldiimidazole ou autre réactif connu à l'homme du métier) ;

1.3) on ajoute le PAG fonctionnalisé de l'étape 2 au milieu de polymérisation des séquences hydrophiles polyAAI et hydrophobes polyAAO, avant, pendant ou après la polymérisation.

5

L'étape 1.1 du procédé s'inspire des techniques connues de polymérisation d'anhydrides de N-carboxy-( $\alpha$ -aminoacides (NCA), décrites, par exemple, dans l'article « Biopolymers, 15, 1869 (1976) » et dans l'ouvrage de H.R. KRICHELDORF «  $\alpha$ -Aminoacid-N-carboxy-Anhydride and Related Heterocycles » Springer Verlag  
10 (1987).

Suivant une variante, lors de l'étape 1.1, on précipite - de préférence dans l'eau- le copolymère poly(AAO)-poly(AAI) obtenu et on recueille ce précipité. Cette variante correspond  
15 à un mode discontinu de préparation de particules, dans lequel on isole le copolymère poly(AAO)-poly(AAI) sous forme de précipité formant un produit intermédiaire stable. Ce précipité peut être, par exemple, filtré, lavé et séché.

De manière plus préférée encore, les NCA-pAAI sont des NCA  
20 d'acide glutamique ou aspartique O-alkylé, par exemple des NCA-Glu-O-Me, NCA-Glu-O-Et ou NCA-Glu-O-Bz (Me = méthyle - Et = éthyle).

Plus généralement, la préparation des particules peut s'opérer e.g. par addition d'un non-solvant de la fraction  
25 hydrophobe à une solution du copolymère amphiphile dissous dans un solvant, avantageusement suite à la synthèse du terpolymère. L'addition de la solution du terpolymère à un non-solvant de la fraction hydrophobe constitue une variante de ce procédé. L'opération consiste préférentiellement à diminuer la  
30 solubilité de la fraction hydrophobe pour qu'elle s'agrège, et ce faisant, à former des **PV**. L'homme de l'art est en mesure de trouver d'autres moyens pour diminuer la solubilité de la fraction hydrophobe du polymère, en modifiant, par exemple, la température, la nature du solvant(s) et du non solvant, ou en  
35 combinant différentes techniques.

Par exemple, lors de cette préparation de suspension colloïdale, les copolymères amphiphiles PAG-poly(AAI)-poly(AAO) de l'étape 1 sont placés dans un milieu aqueux dans lequel au moins une partie des PAG est soluble et au moins une partie des  
5 AAO est insoluble. Les copolymères PAG-polyAAI-polyAAO existent sous forme de nanoparticules dans ce milieu aqueux.

Une alternative pour préparer la suspension de PV selon l'invention consiste à mettre en présence le solide pulvérulent, tel que décrit ci-dessus en tant que produit et  
10 par son procédé d'obtention, avec un milieu aqueux, et en particulier avec de l'eau, non-solvant de la fraction hydrophobe du copolymère amphiphile. Ainsi, les PV peuvent être obtenues dans l'eau en absence de tout solvant ou de tensioactif.

15 De préférence, le ou les bloc(s) PAG fonctionnalisé(s) est (sont) introduit(s) avant et/ou au début de la polymérisation, qui se déroule de préférence à une température comprise entre 20 et 120°C à pression atmosphérique normale.

Avantageusement, les PAG de l'étape 1.2 sont des produits  
20 commerciaux disponibles (PEG e.g.), ou bien encore sont obtenus de manière connue en soi par polymérisation d'oxyde d'éthylène.

D'autres paramètres, comme la concentration en polymère, la température du mélange réactionnel, le mode d'ajout du polymère hydrophile, l'emploi de pression réduite, la durée de  
25 la réaction, etc... sont ajustés selon les effets désirés et bien connus de l'homme de l'art.

La description des caractéristiques des polymères, faite supra dans le cadre de la présentation des particules, peut être intégralement transposée dans le présent exposé relatif au  
30 procédé. C'est ainsi que, conformément au procédé selon l'invention, on peut choisir la nature et la quantité des aminoacides récurrents, ainsi que les conditions opératoires, de manière à obtenir différents types de polymères ayant les caractéristiques susvisées.

Pour effectuer l'association (étape 3) d'un ou plusieurs **PA** aux particules, il est possible de mettre en œuvre plusieurs méthodes conformément à l'invention. Des exemples, non limitatifs, de ces méthodes sont énumérés ci-après.

5        Selon une première méthode, on effectue l'association de **PA** aux particules par mise en présence d'une phase liquide (aqueuse ou non) contenant le **PA** avec la suspension colloïdale de particules.

10       Selon une deuxième méthode, on effectue l'association du **PA** aux particules par mise en présence d'un **PA** à l'état solide avec la suspension colloïdale de particules. Le **PA** solide peut être, par exemple, sous forme de lyophilisat, de précipité, de poudre ou autre.

15       Selon une troisième méthode, on met en présence le solide pulvérulent (**PAA**), tel que décrit supra en tant que produit et par ses caractéristiques d'obtention, avec une phase liquide (aqueuse ou non) contenant le **PA**.

20       Selon une quatrième méthode, on met en présence le solide pulvérulent, tel que décrit supra en tant que produit et par ses caractéristiques d'obtention, avec le **PA** sous forme solide. On disperse ensuite ce mélange de solides, dans une phase liquide, de préférence une solution aqueuse.

Dans toutes ces méthodes, le **PA** utilisé peut être sous forme pure ou préformulée.

25       La préparation des **PV** est avantageusement suivie d'une étape de purification, impliquant des techniques connues à l'homme du métier. Après cette étape facultative de purification, on dispose d'une suspension colloïdale de **PV** que l'on peut utiliser directement, ou qu'il est envisageable  
30 d'isoler ou de recueillir par tout moyen physique connu en soi et approprié, comme par exemple : par filtration, par concentration, par ultrafiltration, par séparation par gradient de densité, par centrifugation, par précipitation, éventuellement par ajout de sel, ou bien encore par  
35 lyophilisation.



Conformément à l'étape facultative 5, on élimine les impuretés (sels) ainsi que le solvant, par tout traitement de séparation physique approprié, par exemple par diafiltration (dialyse) (étape 4), filtration, modification pH, chromatographie, la distillation. De telles méthodes permettent d'éliminer les sels ou les solvants indésirables.

Pour concentrer (étape 6) ou pour séparer (étape 7) les particules structurées obtenues, de leur milieu liquide de suspension, on élimine, éventuellement, la phase aqueuse, par exemple par distillation par séchage (e.g. à l'étuve), par lyophilisation ou tout autre moyen physique convenable : ultrafiltration, centrifugation. On récupère, à l'issue de cette étape 7, un solide pulvérulent, de couleur blanche.

Compte tenu de la taille nanométrique des particules, la suspension peut être filtrée sur des filtres de stérilisation, ce qui permet d'obtenir, aisément et à moindre coût, des liquides médicamenteux injectables stériles. Le fait de pouvoir, grâce à l'invention, contrôler la taille des particules et atteindre des valeurs de diamètre hydrodynamique (Dh) entre 25 et 100 nm, est un atout important.

La présente invention vise, également, de nouveaux produits intermédiaires du procédé décrit ci-dessus, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des copolymères PAG-polyAAI-polyAAO précurseurs de particules.

Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne une suspension et/ou un solide pulvérulent, tels que définis ci-dessus et/ou tels qu'obtenus par le procédé présenté supra, cette suspension et ce solide comprenant au moins un principe actif, choisi, de préférence, parmi :

- les vaccins pris à eux seuls ou associés à au moins un antigène;
- les protéines et/ou les peptides, parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps,

- l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, les facteurs VIII et IX, les interleukines ou leurs mélanges, les facteurs stimulants de l'hématopoïèse ;
- 5 • les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée ;
  - les acides nucléiques et, préférablement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN ;
  - des molécules non peptido-protéiques appartenant à
  - 10 diverses classes de chimiothérapie anticancéreuses et, en particulier, les anthracyclines et les taxoïdes ;
  - et leurs mélanges.

Enfin, l'invention concerne une spécialité pharmaceutique, nutritionnelle, phytosanitaire ou cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comporte une suspension et/ou du solide pulvérulent chargé(s) en **PA** et tels que définis ci-dessus.

Selon un autre de ses objets, l'invention vise, également, l'utilisation de ces **PV** (en suspension ou sous forme solide) chargées en **PA**, pour la fabrication de médicaments du type systèmes à libération contrôlée de **PA**.

Il peut s'agir, par exemple de ceux administrables, de préférence par voie orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, 25 intrapéritonéale, ou intracérébrale.

Les applications cosmétiques envisageables sont, par exemple, les compositions comprenant un **PA** associé aux **PV** selon l'invention et applicables par voie transdermique.

30 Les exemples qui suivent et qui concernent le **PA** hydrophile formé par l'insuline permettront de mieux comprendre l'invention dans ses différents aspects produit/procédé/application. Ces exemples illustrent la préparation de particules de polyaminoacides chargés ou non en

PA, de même qu'ils présentent les caractéristiques de structure et les propriétés de ces particules.

#### LEGENDES DES FIGURES

5 Fig 1 - Schéma d'une particule de vectorisation du type de celles adsorbant le PA.

Fig 2 - Schéma d'une particule de vectorisation du type de celles encapsulant le PA.

Fig 3 - Evolution de la glycémie G (moyenne en % basal) après  
10 injection d'une formulation de PV (exemple 5) chargée en insuline à raison de 0,6 UI/kg, en fonction du temps t (en heures).

Fig 4 - Photographie de PV (exemple 2) au microscope électronique à transmission.

15 Fig 5 - Evolution de la glycémie (moyenne en % basal) et de l'insulinémie moyenne I (en mU/l) chez des chiens, en fonction du temps t (en heures), après injection d'une formulation de PV (exemple 6) chargée en insuline à raison de 0,6 UI/kg.

Fig 6 - Evolution de la glycémie G (moyenne en % basal) et de  
20 l'insulinémie moyenne I (en mU/l) chez des chiens, en fonction du temps t (en heures), après injection d'une formulation de PV (exemple 9) chargée en insuline à raison de 0,6 UI/kg.

#### 25 EXEMPLES

**Exemple 1 : Préparation du poly(leucine)12-bloc-poly(glutamate)35-(polyéthylèneglycol)113.**

30 Les techniques utilisées, pour la polymérisation des NCA en polymères de structures en blocs ou statistiques sont connues de l'homme de l'art et sont détaillées dans l'ouvrage de H. R. KRICHELDORF «  $\alpha$ -aminoacides-N-Carboxy Anhydrides and Related Heterocycles », Springer Verlag (1987). La synthèse suivante  
35 précise la synthèse de l'un d'entre eux.

4,96 g de aminoethyl-PEG (masse molaire 5000; Degré de Polymérisation (DP) 113) sont solubilisés dans 120 ml de NMP à 40°C. On y ajoute 1.4ml MeOH puis, 6.4 g de NCA-GluOMe en une fois. Après 1/2h, 1.8 g de NCA-Leu sont ajoutés et la réaction se poursuit pendant 2h. Ensuite, on ajoute au milieu réactionnel de l'acide chlorhydrique dilué et on chauffe à 80°C pendant 24h. A 50°C, le milieu est neutralisé avec de la soude 6N. On dialyse cet intermédiaire contre de l'eau pour éliminer les résidues solubles de faible taille (solvant, sels). La solution purifiée est lyophilisée pour donner une poudre blanche. Rendement 80%.

**Exemple 2 : Préparation du poly(leucine)12-bloc-poly(glutamate)18 -(polyéthylèneglycol)17**

2,01 g de aminoethyl-PEG (masse molaire 750; DP 17) sont solubilisés dans 45 ml de NMP à 40°C. On y ajoute 1.5ml MeOH puis, 9 g de NCA-GluOMe en une fois. Après 1/2h, 5 g de NCA-Leu sont ajoutés et la réaction se poursuit pendant 2h. Ensuite, on ajoute au milieu réactionnel de l'acide chlorhydrique dilué et on chauffe à 80°C pendant 24h. A 50°C, le milieu est neutralisé avec de la soude 6N. On dialyse cet intermédiaire contre de l'eau pour éliminer les résidues solubles de faible taille (solvant, sels). La solution purifiée est lyophilisée pour donner une poudre blanche. Rendement 80%.

**Exemple 3: Mise en évidence des nanoparticules par Diffusion de la Lumière (DDL) et par Microscopie Electronique à Transmission (TEM).**

10 mg du copolymère obtenu à l'exemple 1 ou 2 sont suspendus dans 10 ml d'eau ou une solution aqueuse de sel. Cette solution est ensuite introduite dans un granulomètre Coulter (ou

diffractomètre laser). Les résultats de l'analyse de la granulométrie des différents produits testés sont présentés dans le tableau 1 suivant.

Tableau 1 - Mesures de la taille des PV

5

Exemple	Polymère	Taille (nm)
1	PEG <sub>113</sub> -(GLU) 35-(LEU) <sub>12</sub>	80
2	PEG <sub>17</sub> -(GLU) 18-(LEU) <sub>12</sub>	41

On photographie par ailleurs au microscope électronique à transmission (Fig.4 ci-jointe), les particules de vectorisation PV préparées dans le présent exemple par mise en suspension du  
 10 copolymère amphiphile de l'exemple 2 dans l'eau.

**Exemple 4 : Test d'association des nanoparticules avec une protéine (l'insuline).**

15 A partir d'une solution tampon phosphate isotonique de pH 7,4, on prépare une solution d'insuline humaine titrée à 1,4 mg/ml correspondant à 40 UI/ml. Dans 1 ml de cette solution d'insuline, on disperse 10 mg du copolymère amphiphile selon l'exemple 1 ou 2. Après 15 heures d'incubation à température  
 20 ambiante, l'insuline associée aux particules de vectorisation PV et l'insuline libre sont séparées par centrifugation (60 000 g, 1 heure) et ultrafiltration (seuil de filtration 300 000 D). L'insuline libre récupérée dans le filtrat est dosée par Chromatographie Liquide Haute Performance ou par ELISA et l'on  
 25 en déduit par différence la quantité d'insuline associée.

Le tableau 2 suivant rassemble les résultats des mesures de taux d'association effectuées sur différents PV. Le taux d'association exprime le pourcentage d'insuline associée par rapport à l'insuline engagée dans une préparation titrée à  
 30 1.4mg/ml d'insuline et 10 mg/ml de PV. Cette valeur est transformée en un taux de chargement qui exprime la quantité

maximale en mg d'insuline que peuvent s'associer avec 100 mg de PV.

Tableau 2 - Mesures du taux d'association avec l'insuline pour  
5 un mélange 0.14 mg INSULINE/mg PV

Exemple	Polymère	Taux max. de chargement mg/100mg PV
1	PEG <sub>113</sub> - (GLU) 35- (LEU) 12	10
2	PEG <sub>17</sub> - (GLU) 18- (LEU) 12	19

Exemple 5 : Pharmacocinétique et pharmacodynamie des PV-  
10 charges avec l'insuline chez le chien sain à jeun.

La suspension de PV chargée en insuline préparée à l'exemple 4.  
a été injectée à deux chiens, rendus diabétiques par  
pancréatectomie totale, et à jeun de la veille au soir.  
15 L'administration à 11 heures du matin par voie sous cutanée  
thoracique de la préparation a été faite à la posologie de  
0,5 UI/kg d'insuline par Kg de poids vif de l'animal. Le volume  
administré est compris entre 0,18 et 0,24 ml. Au temps -4, -2,  
0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 et 48  
20 heures, 1 ml de sang sont prélevés par ponction jugulaire sous  
vide sur tube héparinate de sodium. 30 µl de sang total sont  
utilisés extemporanément pour mesure de la glycémie. Le tube  
est ensuite centrifugé, décanté et le plasma stocké à -20° C  
pour dosage de l'insuline. Les résultats présentés dans la  
25 figure 3 ci-après montrent un effet hypoglycémiant important  
(sur les deux animaux) qui se prolonge au moins jusqu'à 24  
heures après l'injection.

Tableau 3 - Mesures du temps d'action de l'insuline (effet hypoglycémiant) en présence de PV selon l'invention

Exemple	Polymère	Temps de retour au niveau basal de la glycémie (en heures)	
	INSULINE SOLUBLE (SANS PV)	1	
1	PEG <sub>113</sub> -(GLU) <sub>35</sub> -(LEU) <sub>12</sub>	-	-
2	PEG <sub>17</sub> -(GLU) <sub>18</sub> -(LEU) <sub>12</sub>	≥ 30	FIGURE 3

- 5 Cet exemple démontre la non dénaturation de l'insuline en présence de PV selon l'invention.
- De plus, cet exemple permet de mettre en évidence l'augmentation à plus de 30h de la durée d'action de l'insuline par rapport à l'insuline non formulée, et donc, l'utilité des
- 10 PV en tant que système retard pour la libération contrôlée de l'insuline. Elle montre également comment il est possible de maîtriser la durée d'action par le choix judicieux du groupement hydrophobe.

15

**Exemple 6 comparatif: Préparation du polymère - poly(leucine)<sub>40</sub>-bloc-(polyéthylèneglycol)<sub>113</sub>.**

- 20 *Synthèse de la poly(Leu)<sub>40</sub>-PEG:* 10 g de NCA-Leu sont solubilisés dans 150 ml de NMP à 60°C. 5 ml d'une solution de 2 g de aminoéthyl-PEG (Mw 5000) dans 50 ml de NMP sont ajoutés au monomère en une fois. Après 2 h, on vers le milieu réactionnel dans 1L d'eau. Le précipitat formé est filtré, lavé et séché. Rendement >95%.
- 25 Le précipitat est dissout dans 100ml d'acide trifluoroacétique, puis on y ajoute 40 ml d'eau sur une période d'une heure. La suspension est ensuite neutralisé à l'aide de la soude, dialysé contre de l'eau pour éliminer les sels ainsi formés, et lyophilisé pour obtenir un produit solide.

30

**Exemple 7 comparatif : Pharmacocinétique et pharmacodynamie des PV-associés avec l'insuline chez le chien sain à jeun.**

Les PV de l'exemple 6 sont formulées puis injectées dans des animaux selon le protocole donné à l'exemple 5. Les résultats présentés dans la figure 5 ci-après, montrent un effet hypoglycémiant (sur les deux animaux) et qui se prolonge jusqu'à 20 heures après l'injection.

10

**Exemple 8 : comparatif de stabilité de la formulation**

Les PV de l'exemple 6, PEG-Leu<sub>25</sub> sont formulées selon l'exemple 7. La formulation, après un repos de 1 mois à +4°C, forme un dépôt de précipitat, qui ne se dissout pas à 35°C, montrant l'instabilité de cette formulation de PV.

Les PV de l'exemple 1 (poly(leucine)<sub>12</sub>-bloc-poly(glutamate)<sub>35</sub> - poly(éthylèneglycol-)<sub>113</sub> sont formulées selon l'exemple 7. La formulation, après un repos de 1 mois à +4°C, reste transparente et ne forme pas de dépôt de précipitat, montrant la stabilité de cette formulation de PV et donc l'avantage d'un polymère tribloc PEG-polyAAI-polyAAO par rapport au copolymère dibloc PEG-polyAAO.

25

**Exemple 9 comparatif: Préparation du polymère - poly(leucine)<sub>12</sub>-bloc-(glutamate de sodium)<sub>35</sub> et son analyse pharmacodynamique.**

Le polymère est réalisé selon l'exemple 1 avec la modification suivante, l'aminoéthyl-PEG de Mw = 5000 et de DP = 113 est remplacé par une quantité équivalente en moles d'ammoniaque. Les PV sont isolées, formulées et injectées selon les exemples précédents (exemples 2 et 5) à raison de 50mg de PV pour 100UI d'insuline. Les résultats présentés dans la figure 6 ci-après

30



montrent un effet hypoglycémiant (sur les deux animaux) et qui se prolonge jusqu'à 20 heures après l'injection.

5

Commentaires:

tableau 4 comparatif des durées d'action in vivo de l'insuline nue, de l'insuline associée à des systèmes de vectorisation de l'art antérieur (exemples comp 6 et 8) et de l'insuline associée aux particules de vectorisation selon l'invention (exemple 2)

Exemple	Polymère	Temps de retour au niveau basal de la glycémie (h)	
	INSULINE SOLUBLE (SANS PV)	1	
2	PEG <sub>17</sub> -(GLU) <sub>18</sub> -(LEU) <sub>12</sub>	≥ 30	FIGURE 3
6 comp	PEG <sub>113</sub> -LEU <sub>40</sub>	20	FIGURE 5
8 comp	(GLU) <sub>35</sub> -(LEU) <sub>12</sub>	20	FIGURE 6

15

Il ressort de ce tableau que le système selon l'invention (exemple 2) possède une durée d'action in vivo largement supérieure ( + de 30h contre 20h) à celles des systèmes de l'art antérieur (WO 96/29991): exemples 6 et 8.

20

## REVENDICATIONS

- 1- Suspension colloïdale de particules submicroniques  
5 susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation  
de principe(s) actif(s) (PA), ces particules étant des  
arrangements supramoléculaires individualisés,  
caractérisée en ce que ces particules:
- sont à base d'au moins un copolymère amphiphile  
10 comprenant :
    - ✓ au moins un bloc de polymère(s) hydrophile(s) du type  
polyalkylèneglycol (PAG), de préférence polyéthylène-  
glycol (PEG) ;
    - ✓ et au moins un copolyaminoacide(s) (PAA) amphiphile  
15 linéaire(s), à enchaînements  $\alpha$ -peptidiques;
  - et sont aptes à s'associer en suspension colloïdale à  
l'état non dissous, avec au moins un PA et à libérer  
celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou  
retardée.  
20
- 2- Suspension selon la revendication 1, caractérisée en ce  
que les AminoAcides du (ou des) copolyaminoacide(s) (PAA)  
amphiphile (s) composant les particules sont d'au moins deux  
types :
- 25 • un premier type comprenant au moins un AminoAcide  
hydrophile(AAI), de préférence sélectionné(s) dans le groupe  
comprenant :
    - les AminoAcides à chaîne(s) ionisable(s), au moins  
partiellement ionisés, de préférence Glu et/ou Asp et  
30 leurs sels et/ou Lys;
    - et leurs mélanges.
  - un deuxième type comprenant au moins un AminoAcide  
hydrophobe(AAO), de préférence sélectionné(s) dans le groupe  
35 comprenant :

- les acides aminés neutres naturels, avantageusement ceux du sous-groupe : Leu, Ile, Val, Ala, Pro, Phe, et leurs mélanges ;
- 5 ➤ des acides aminés neutres, rares ou synthétiques , avantageusement ceux du sous-groupe : norleucine, norvaline et leurs mélanges;
- 10 ➤ des dérivés des acides aminés polaires avantageusement ceux du sous-groupe : glutamate de méthyle, glutamate d'éthyle, aspartate de benzyle, N-acétyllysine et leurs mélanges;
- et leurs mélanges.

3- Suspension selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le copolyaminoacide(s) (PAA) amphiphile (s) composant  
15 les particules comporte au moins un séquence globalement hydrophile et au moins une séquence globalement hydrophobe.

4- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le copolyaminoacide(s) (PAA)  
20 amphiphile (s) composant les particules présente une structure "statistique".

5- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le copolyaminoacide(s) (PAA)  
25 amphiphile (s) composant les particules présente une structure "bloc".

6- Suspension selon la revendication 5, caractérisée en ce que le PAA amphiphile "bloc" comporte avantageusement:  
30 o au moins une séquence globalement hydrophile essentiellement constituée d'acides aminés AAI, et ayant une longueur absolue supérieure ou égale à 5 monomères AAI, de préférence supérieure ou égale à 200 monomères AAI, et

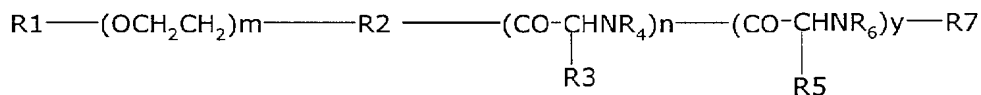
plus préférentiellement encore comprise entre 10 et 50 monomères AAI

- o et au moins une séquence globalement hydrophobe essentiellement constituée d'acides aminés AAO, ayant une longueur absolue supérieure ou égale à 5 monomères AAO, de préférence supérieure ou égale à 10 monomères AAO, et plus préférentiellement comprise entre 10 et 50 monomères AAO.

10

7-. Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le PAG hydrophile - de préférence le PEG -, se présente sous la forme d'un bloc dont la longueur absolue est supérieure ou égale à 5 monomères, de préférence comprise entre 5 et 120 monomères, et plus préférentiellement encore comprise entre 5 et 50 monomères.

8- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 et 5 à 7, caractérisée en ce que les particules sont constituées de chaînes de copolymères "triblocs linéaires" PEG-AAI-AAO, correspondant de préférence à la formule suivante:



25

dans laquelle :

- ➔ R1 = H, alkyle linéaire ou branché en C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (substitué ou non), aryle de préférence benzyle (substitué ou non);
- ➔ R2 = NH, CO-NH, CS-NH, R8-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-R9 avec R8, R9 choisi indépendamment parmi = OCO, OCONH, NHCO, NHCONH, CONH, COO, NH, CO; t = 1-6, [NHCH(R1)CO-]<sub>x</sub>;
- ➔ R3 = radicaux identiques ou différents le long de la chaîne et choisis parmi les groupements

30

- définissant des aminoacides hydrophiles, ionisables (naturels ou dérivés synthétiques) à savoir de préférence les groupements  $(CH_2)_pC_6H_4OM$ ,  $(CH_2)_pCO_2M$ ,  $(CH_2)_pN(H_cR1_d)_3X$  avec  $p \geq 1$ , de préférence = 1 ou 2; a et b sont des valeurs comprise entre 0 et 3 et  $a+b = 3$ ; X étant de préférence un anion chlorure, bromure, sulfate, nitrate, hydrogéo-phosphate, acétate, lactate;
- ➔ R4 = radicaux identiques ou différents le long de la chaîne et choisis parmi les groupements H, Me;
- ➔ R5 = radicaux identiques ou différents le long de la chaîne et choisis parmi les groupements définissant des aminoacides hydrophobes (naturels ou dérivés synthétiques) à savoir de préférence les à savoir de préférence les groupements H, R1,  $(CH_2)_qC_6H_5$ ,  $(CH_2)_qC_6H_4OR1$ ,  $(CH_2)_qOR1$ ,  $(CH_2)_qCO_2R1$ ,  $(CH_2)_qCON(R1)_2$ , avec  $q \geq 1$ , de préférence = 1 ou 2;
- ➔ R6 = R4;
- ➔ R7 = H, R1CO avec R1 tel que défini supra, alkyle linéaire ou branché en  $C_1-C_{20}$  (substitué ou non), aryle de préférence benzyle (substitué ou non), hydroxyalkyle en  $C_1-C_6$ , H,  $-(CH_2)_wOH$ ,  $-(CH_2)_wCO_2M$ ,  $-(CH_2)_w(CHR1)_zOH$ ,  $-(CH_2)_wNH_2$ ,  $-(CH_2)_yC_6H_4OH$ ,  $(CH_2)_yCON(R1)_2$ ; R10 = H, Me,  $(CH_2)_vOH$ , avec w, z et v  $\geq 1$  et M = métal ou cation, typiquement un métal alcalin comme Na, Li, K, ou  $NH_4$ ,  $R1NH_3$ ;
- ➔  $m > 1$ ;  $n > 3$ ;  $y \geq 0$ .

9- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que les particules de vectorisation (PV) ont une taille moyenne comprise entre 10 à 500 nm, de préférence entre 10 et 200 nm.

10- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que les particules de vectorisation (PV) comprennent au moins un principe actif.

5 11- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle est aqueuse et stable.

12- Solide pulvérulent, caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir de la suspension selon l'une quelconque des  
10 revendications 1 à 11.

13- Procédé de préparation d'un solide pulvérulent obtenu à partir de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 et 5 à 11,  
15 caractérisé en ce que :

- 1) on fait réagir au moins un bloc PAG comprenant au moins un monomère alkylène-glycol, avec au moins une séquence hydrophile de PAA comprenant au moins un monomère aminoacide AAI hydrophile et avec au moins  
20 une séquence hydrophobe de PAA comprenant au moins un monomère aminoacide AAO hydrophobe, ce bloc de PAG et ces séquences comprenant chacun au moins une fonction réactive de façon à obtenir un copolymère amphiphile "bloc" PAG/polyAAI/polyAAO ;
- 25 2) on transfère le copolymère amphiphile bloc PAG/polyAAI/polyAAO obtenu à l'étape 1, dans un milieu non-solvant de la (des) fraction (s) hydrophobe(s) du copolymère amphiphile - de préférence dans l'eau -, ce qui conduit à la formation spontanée de particules de  
30 vectorisation de PA ;
- 3) éventuellement on dialyse le milieu réactionnel pour purifier la suspension aqueuse de particules structurées;
- 35 4) éventuellement on concentre cette suspension de l'étape 3;

- 5) éventuellement on associe au moins un principe actif PA avec les particules de l'étape 2, 3 ou 4 ;
- 6) on élimine le milieu liquide pour recueillir le solide pulvérulent comprenant les particules chargées ou non.

5

14- Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'on met en présence d'un milieu aqueux non-solvant de la fraction hydrophobe du copolymère amphiphile, le solide pulvérulent selon la revendication 12 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 13.

15- Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes 1,2,3,4 et éventuellement 5 du procédé selon la revendication 13.

16- Procédé de préparation de la suspension selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'on effectue l'association du PA aux particules, par mise en présence d'une phase liquide contenant ledit PA hydrophile avec la suspension colloïdale de particules.

17- Procédé de préparation de la suspension selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'on effectue l'association du PA aux particules par mise en présence dudit PA à l'état solide avec la suspension colloïdale de particules.

18- Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'on met en présence le solide pulvérulent selon la revendication 12 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 13, avec une phase liquide contenant le PA.

35

19- Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'on met en présence le solide pulvérulent selon la revendication 12 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le  
5 procédé selon la revendication 13, avec le PA sous forme solide et en ce que l'on disperse ce mélange de solides dans une phase liquide, de préférence une solution aqueuse.

20- Produits intermédiaires du procédé selon la  
10 revendication 13, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des copolymères amphiphiles PAA du genre "bloc" PAG/polyAAI/polyAAO, de préférence PEG/polyGlu ou Asp/polyAANO, précurseurs de particules.

15 21- Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 et/ou obtenue par le procédé selon la revendication 13 et/ou solide pulvérulent selon la revendication 12 comprenant un moins un principe actif choisi, de préférence, parmi :

- 20 o les vaccins pris à eux seuls ou associés à au moins un antigène;
- o les protéines et/ou les peptides, parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps,  
25 l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, les facteurs VIII et IX, les interleukines ou leurs mélanges, les facteurs stimulants de l'hématopoïèse ;
- o les polysaccharides, l'héparine étant plus  
30 particulièrement sélectionnée ;
- o les acides nucléiques et, préférentiellement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN ;
- o des molécules non peptido-protéiques appartenant à diverses classes de chimiothérapie anti-cancéreuses



et, en particulier, les anthracyclines et les  
taxoïdes ;  
o et leurs mélanges.

5           22-       Spécialité       pharmaceutique,       nutritionnelle,  
phytosanitaire ou cosmétique, caractérisée en ce qu'elle  
comporte une suspension selon l'une quelconque des  
revendications 1 à 11 et/ou obtenue par le procédé selon la  
revendication 13 et/ou du solide pulvérulent selon la  
10 revendication 12.

1/3

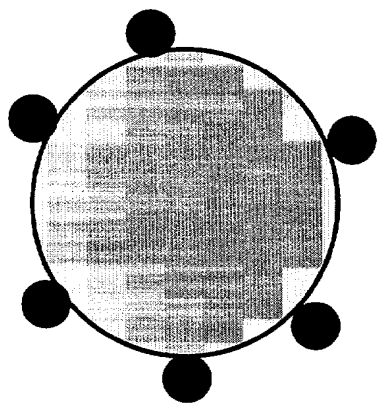


FIG. 1

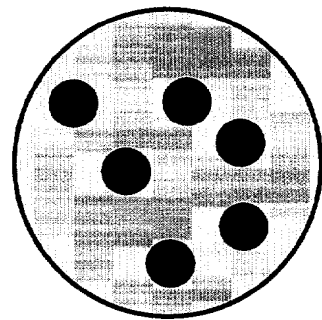
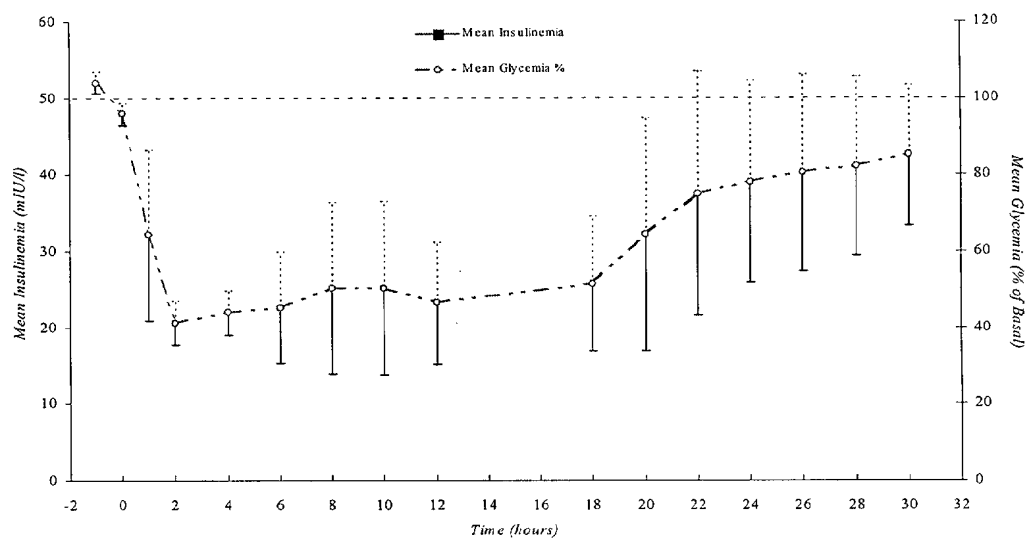
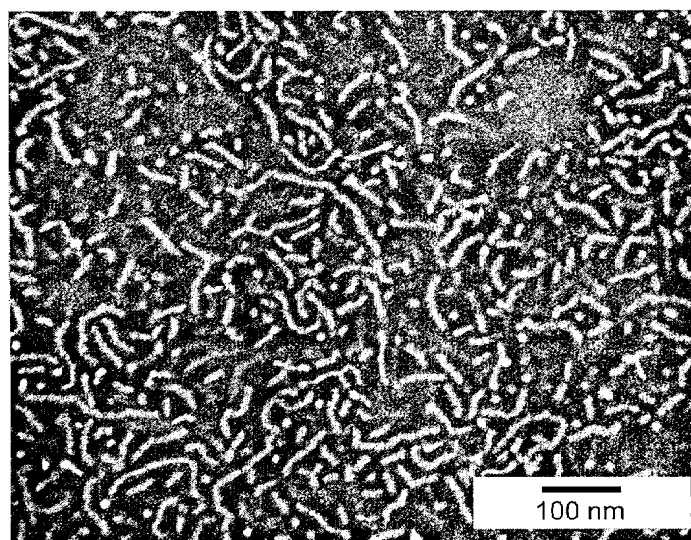
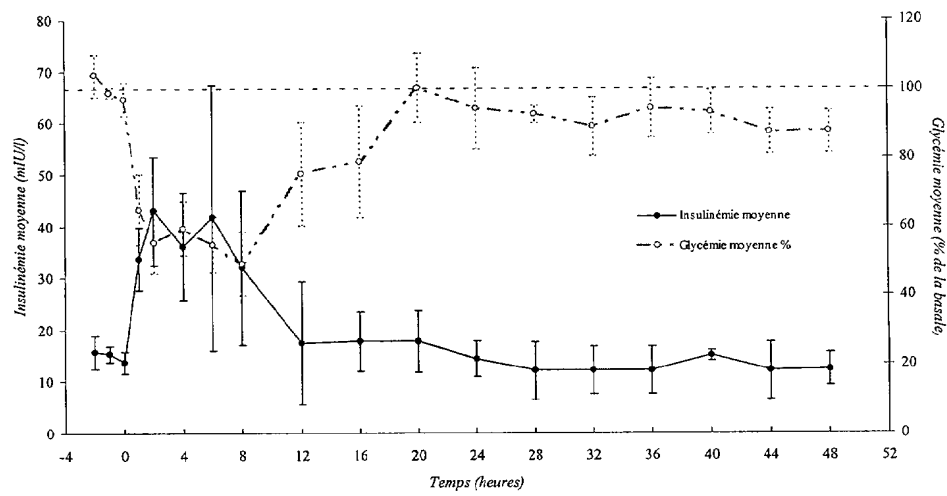
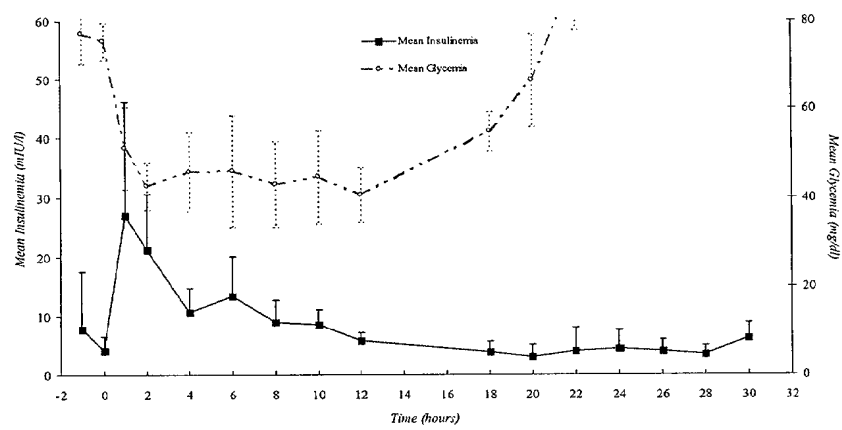


FIG. 2

2/3

**FIG. 3****FIG. 4**

3/3

**FIG. 5****FIG. 6**



2822834

# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 608782  
FR 0104512

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	M. YOKOHAMA ET AL.: "Incorporation of water-insoluble anticancer drug into polymeric micelles and control of their particle size" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 55, no. 2-3, 13 novembre 1998 (1998-11-13), pages 219-229, XP004143517 Amsterdam (NL) * le document en entier *	1,2,4,7, 9-12,22	C08G69/40 C08G81/00 C08J3/05 A61K47/48 A61K9/16 A61K9/51 B01J13/00
X	GB 2 240 547 A (CIBA-GEIGY AG) 7 août 1991 (1991-08-07) * revendications 1,3,5 *	1	
A	FR 2 786 098 A (FLAMEL TECHNOLOGIES S.A.) 26 mai 2000 (2000-05-26) * le document en entier *	1-22	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 février 2002		Benz, K	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0104512 FA 608782**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.  
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 08-02-2002  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB 2240547 A	07-08-1991	AUCUN	
FR 2786098 A	26-05-2000	FR 2786098 A1	26-05-2000
		AU 1278000 A	13-06-2000
		EP 1131056 A1	12-09-2001
		WO 0030618 A1	02-06-2000